

免疫賦活によるラット肝転移巣形成の抑制

熊本大学第1外科

山下 亮一、平岡 武久、神本 行雄、宮内 好正

PREVENTION OF GROWTH OF HEPATIC METASTASES BY IMMUNOACTIVATION IN RAT

Ryoichi YAMASHITA, Takehisa HIRAOKA, Yukio KAMIMOTO
and Yoshimasa MIYAUCHI

First department of Surgery, Kumamoto University Medical School

免疫能低下による肝転移巣形成防止対策としてのOK-432投与の意義をラット腹水肝癌AH130をDonryuラットの門脈内に注入し、肝転移巣を作成するモデルで検討した。

AH130移植後14日目の肝転移巣数は実験群(n=8) 71.5±45.9 (SD), 対照群(n=8) 149.3±61.9であった(p<0.01), AH130移植後の生存日数は実験群33.4±8.1日(n=9), 対照群21.8±6.9日(n=6)であった(p<0.01)。ラット末梢血T cell subsetはW3/25HLK⁺が実験群51.9±7.0% (n=7), 対照群41.8±7.2% (n=6)であった(p<0.025)。免疫能賦活は肝転移巣形成の抑制に有効であった。

索引用語：肝転移抑制, OK-432, ラット腹水肝癌

はじめに

消化器癌の手術においては原発巣の切除が可能で手術の時点で治癒切除と判断されても術後肝転移巣が発見されることがある。このような肝転移巣は手術時すでに存在していた微小転移巣がその後増大したものが、手術時の操作に伴う腫瘍細胞の血中への遊離による転移の結果生じたものであるか判別は困難である。しかし消化器癌において肝転移巣の有無は予後を左右する重大な要因であり、肝転移の抑制は非常に重要な問題となっている。

開腹手術や麻酔は一般の患者においても癌患者においてもさらに動物実験においても免疫能を低下させることが報告されている^{1)~3)}。一方、手術時には手術操作による腫瘍細胞の血中への遊離も転移巣の形成に関してはひとつの要因と考えられている。これらのことは手術前後の時期が転移巣の形成にとって多くの問題を含んだ重要な時期であることを示している。われわれはこのような観点からラットを使用し免疫能賦活による肝転移巣形成の抑制効果を検討した。

I. 実験材料および方法

1. 実験動物および腫瘍

実験には体重200g~250gの雄のHOS-Donryuラット44匹を用いた。腫瘍は佐々木研究所提供によるラット腹水肝癌AH130を用いた。腹水肝癌AH130はDonryuラット腹腔内で7日ごとに継代し、実験には継代7日目の腫瘍を使用した。

2. 免疫賦活剤

免疫能の賦活にはOK-432(中外製薬株式会社Picibanil)を用いた⁴⁾。実験にはOK-432 50KE vialを生理食塩水2mlにて溶解し使用した。

3. 方法

1) 実験群(A群)と対照群(B群)の作成

A群: Donryuラット腹腔内にOK-432 5KE/0.2ml(約25KE/kg)を7日間連日投与した。

B群: A群と同様にDonryuラット腹腔内にOK-432のかわりに生理食塩水0.2mlを7日間連日投与した。

2) 肝転移巣モデルの作成

A群およびB群のDonryuラットをエーテル浅麻酔下に腹部下中切開にて開腹し、十二指腸を翻転し門脈本幹を直視下に26-gauge注射針にて穿刺し腹水肝癌AH130を注入した。腹水肝癌AH130は門脈内注入

に先だつて Hanks 液 (Hanks' balanced salt solution) に浮遊させ腫瘍数を 5×10^6 cell/ml に調整し、ラット門脈内には 10^6 cell/0.2ml を漏出しないようゆっくり注入した。注入後は穿刺部を約 5 秒間軽く圧迫し止血を行った。

3) 効果の評価

a. 肝転移巣数

1), 2) の方法で作成した A 群 8 匹, B 群 8 匹のラットについて AH130 門脈内流入後 14 日目に屠殺し、肝臓を摘出した。摘出した肝臓は 10% formaldehyde 固定後 3mm 幅で全割し全割面で肝転移巣数を検討した。屠殺の際には肺も同時に摘出し肺転移巣の有無も検討した。

b. 生存日数

a で使用した 16 匹のラットとは別に 1), 2) の方法で作成した A 群 9 匹, B 群 6 匹について腹水肝癌 AH130 門脈内注入後の生存日数を比較した。死亡時に全例剖検を行い、肝転移、肺転移の状況を確認した。

c. OK-432 投与によるラット末梢血 T cell subset の変化について

a, b で使用した 31 匹のラットとは別に 1) の方法で A 群 7 匹, B 群 6 匹を作成した。OK-432 投与終了の翌日、エーテル浅麻酔下に開腹し下大静脈を穿刺し 5ml の採血を行なった。

T cell subset の測定には monoclonal 抗体 W3/13 HLK, W3/25HLK, OX8-HL を用い、flow cytometry 法にて測定した⁶⁾。

d. 肝転移巣周辺の組織所見について

a で肝転移巣数を比較した肝臓の固定標本は hematoxylin-eosine 染色を行い、肝転移巣周辺の組織所見を光顕下に検討し A 群, B 群で比較した。

II. 結 果

1. 肝転移巣数

腹水肝癌 AH130 門脈内注入後 14 日目の肝転移巣数は A 群 71.5 ± 45.9 (n=8), B 群 149.3 ± 61.9 (n=8) で A 群は B 群にくらべて有意に肝転移巣数が少なかった ($p < 0.01$)。剖検時に肺転移巣は A 群, B 群いずれにも認められなかった (図 1, 2, 3)。

2. 生存日数

腹水肝癌 AH130 門脈内注入後の生存日数は A 群

図 1 腹水肝癌 AH130 門脈内注入後 14 日目の摘出肝 (A 群)

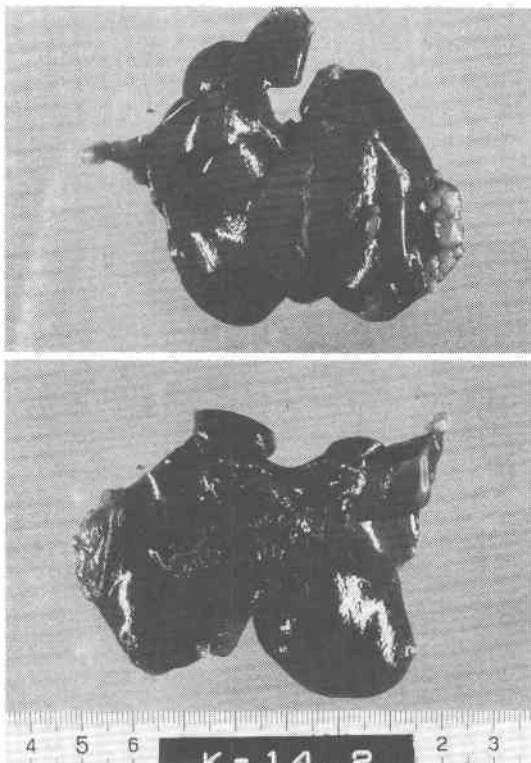


図 2 腹水肝癌 AH130 門脈内注入後 14 日目の摘出肝 (B 群)

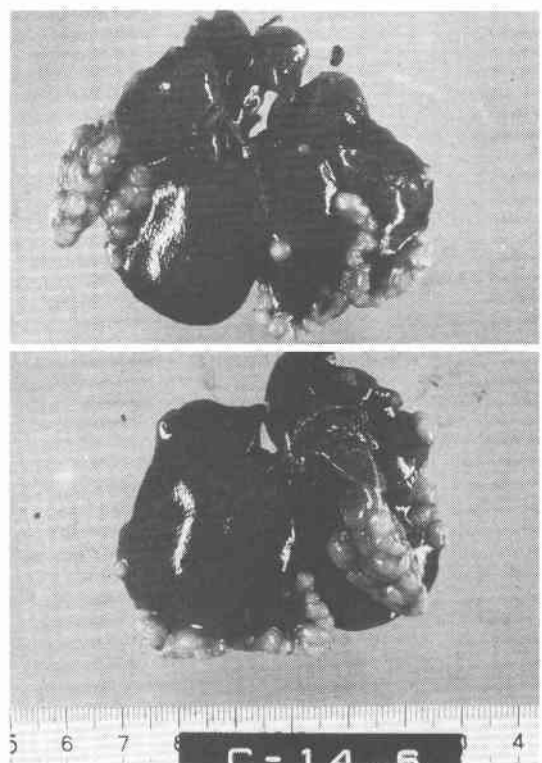


図3 腹水肝癌 AH130門脈内注入後14日目の肝転移巣数 (mean±SD.)

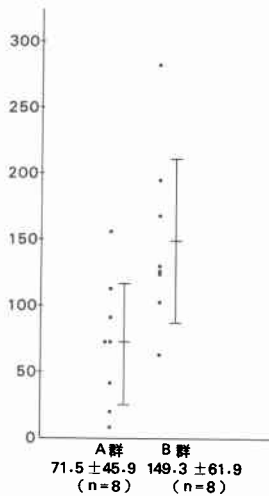
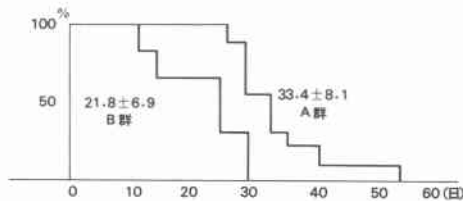


図4 腹水肝癌 AH130門脈内注入後の生存日数 (mean±SD.)



33.4±8.1日 (n=9), B群21.8±6.9日 (n=6)であった。A群はB群にくらべ有意に生存日数の延長を認めた (p<0.01)。死亡時の剖検ではすべてのラットに著明な肝転移が認められた。肺転移はA群で1匹, B群で2匹に認められた。A群, B群全例癌死であった (図4)。

3. ラット末梢血 T cell subset の変化

A群7匹, B群6匹の末梢血 T cell subset を W3/13HLK, W3/25HLK, OX8-HL を用いて検討した結果 W3/25HLK⁺ は A群51.9±7.0% (n=7), B群41.8±7.2% (n=6) で A群は B群にくらべ有意に高い値を示した (p<0.025)。W3/13HLK⁺, OX8-HL⁺ は A群, B群間に差を認めなかった (表1)。

4. 肝転移巣周辺の組織所見

A群において多くの肝転移巣周辺に著明な小円形細胞浸潤が認められた。B群の肝転移巣周辺ではごく軽度の小円形細胞浸潤を認めるにすぎなかった (図5)。

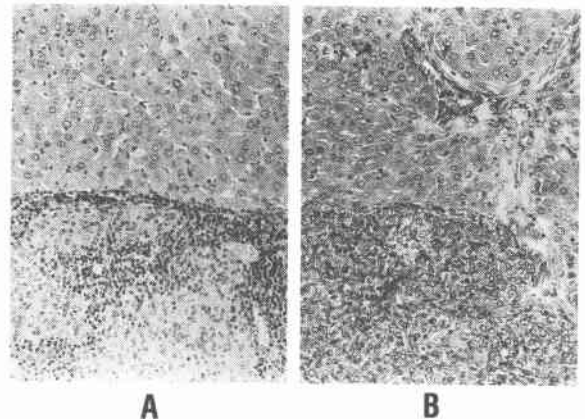
表1 T cell subset

	A 群	B 群	
	(n=7) %	(n=6) %	p
W3/13 HLK ⁺	65.3±7.3*	58.8±6.0	NS**
W3/25 HLK ⁺	51.9±7.0	41.8±7.2	<0.025
OX 8 - HL ⁺	16.2±1.9	15.9±4.7	NS

* mean±SD ** 有意差なし

図5 肝転移巣周辺の組織像, hematoxylin-eosine 染色 (×400)

A: OK-432投与群, B: OK-432非投与群



III. 考 察

動物実験による肝転移巣の形成について数多くの報告があり⁷⁻¹⁰⁾, それらの方法にもとづき実験的に肝転移を抑制する研究が種々の方法や, 薬剤の使用により行われてきている。抗癌剤を使用したり, 抗凝固剤を使用した多くの報告がみられ¹¹⁾¹²⁾, 最近では prostacyclin を使用した報告もみられる¹³⁾。

抗癌剤の長期間の使用はその強力な細胞障害性のため種々の問題が生じ, 抗癌剤の使用が血管内皮細胞を障害しその抵抗性を減弱させ逆に転移を増大させたとの報告もみられる¹⁴⁾。一方, 抗凝固剤は血中に遊離した腫瘍細胞の着床を阻害することが主たる作用であり, 究極的には抗腫瘍性を有する他の薬剤の併用が必要になってくるものと思われる。さらに大量の抗凝固剤は出血傾向を生じ, 手術の前後の時期に使用することには問題がある。

手術はそれにとりなり麻酔とともに免疫能を低下させ, しかも手術操作によって腫瘍細胞の血中への遊離もおこり, 手術の時期は癌の転移巣形成にとって非常に重要な時期であると思われる。手術前後の時期にお

ける免疫能の賦活はこの点からその効果が期待されるものであるが、さらに手術により腫瘍細胞の絶対数が大幅に削減されるこの時期は、免疫賦活剤による抗腫瘍効果が最大限に発揮されると考えられ、免疫賦活剤の使用には最も適した時期であると思われる。

今回われわれは広く使用されている免疫賦活剤のひとつである OK-432 を用いて、その肝転移巣形成抑制効果を実験的に検討した。

OK-432 は 2 つの抗腫瘍作用を有している。第 1 は OK-432 が直接腫瘍細胞を障害し抗腫瘍性を発揮するものであり、第 2 は OK-432 が宿主の免疫能を賦活することによりこの免疫能を介して抗腫瘍性を発揮するものである¹⁵⁾。OK-432 の直接の腫瘍細胞障害作用には対象となる腫瘍細胞によって薬剤感受性の差が種々の程度に認められている。今回実験に用いたラット腹水肝癌 AH130 に対しての OK-432 の直接細胞障害作用はほとんどないことが確認されている¹⁶⁾。

実験的な OK-432 の投与方法としては、腫瘍細胞を移植する前に投与方法、同時に投与方法、そして腫瘍細胞移植した後に投与方法の 3 つが考えられる。田中らは、OK-432 をラット腹水肝癌 AH7974 に対して使用する実験で OK-432 を AH7974 移植前に投与方法の場合のみ効果を認めたと報告している¹⁷⁾。これとは逆に腫瘍細胞移植後に OK-432 を投与方法の場合のみ効果を認めたとの報告もある¹⁸⁾。このような投与方法による効果出現の相違は、実験系の違いにより種々に生じると考えられる。われわれは AH130 移植前に OK-432 を投与方法の実験を行い効果を認めた。

OK-432 の抗腫瘍効果については数多くの研究が行われ報告されているが、OK-432 は非特異的に macrophage を活性化させる¹⁷⁾¹⁹⁾、この macrophage 活性化こそが宿主免疫能賦活機構の重要な要素である²⁰⁾。さらに OK-432 は macrophage だけでなく reticulo endothelial system (RES) 全体の機能を賦活することが認められている²¹⁾。また OK-432 は non specific killer cell を活性化させ²⁰⁾²²⁾、T リンパ球機能を活性化することが報告されている²²⁾²³⁾。われわれの実験においてもラット末梢血 T cell subset の測定で、OK-432 の腹腔内投与方法により T リンパ球の分化が促進され W3/25 HLK⁺ 分画が増加したことが確かめられた。また肝転移巣周辺の組織所見で認められた小円形細胞浸潤も OK-432 投与方法による T リンパ球機能の活性化と関連あることを示していると思われた。

門脈から注入移植された腫瘍細胞はそのほとんどが

肝臓に trap される⁹⁾。その後の腫瘍細胞の増殖や転移巣の形成は、宿主の防禦機構の違いにより差が生じてくるものと考えられる。われわれの実験における OK-432 の効果は、OK-432 の直接の抗腫瘍作用によるものではなく、宿主の免疫能を賦活することによって好結果をもたらしたものと思われる。

今回の動物実験と臨床にみられる肝転移とでは多くの点で相違点があり臨床ではさらに複雑な問題を有しているが、この実験結果からみて、消化器癌患者の手術前後の時期における免疫賦活療法は、肝転移巣形成の抑制に関してある程度の効果が期待され、消化器癌患者の予後の改善につながるものと考えられた。

ま と め

1. Donryu ラットの門脈内に腹水肝癌 AH130 を注入して実験的肝転移巣を作製した。
2. 免疫賦活剤 OK-432 を AH130 注入前にラット腹腔内に投与方法し、その肝転移抑制効果を検討した。
3. AH130 注入後 14 日目の肝転移巣数は、OK-432 投与方法群は対照群より有意に少数であった。
4. AH130 注入後の生存日数は、OK-432 投与方法では対照群より有意に延長をみとめた。
5. ラット末梢血 T cell subset の検索では、OK-432 投与方法で対照群より有意に W3/25HLK⁺ の増加が認められた。
6. 免疫能賦活によるラット肝転移巣形成の抑制効果が認められた。

文 献

- 1) Slade MS, Simmions RL, Yunis E et al: Immunodepression after major surgery in normal patient. *Surgery* 78: 363—372, 1975
- 2) Roth JA, Golub SH, Grimm EA et al: Effects of operation on immune response in cancer patients: Sequential evaluation of in vitro lymphocyte function. *Surgery* 79: 46—51, 1976
- 3) Tarpley JL, Twomey PL, Catalona WJ et al: Suppression of cellular immunity by anesthesia and operation. *J Surg Res* 22: 195—201, 1977
- 4) Okamoto H, Shoin S, Koshimura S et al: Studies on the anticancer and streptolysin S-forming abilities of hemolytic streptococci. *Jpn J Microbiol* 11: 323—336, 1967
- 5) Williams AF, Galfre G, Milstein C: Analysis of cell surfaces by xenogeneic myeloma hybrid antibodies: Differentiation antigens of rat lymphocytes. *Cell* 12: 663—673, 1977
- 6) Brideau RJ, Cartter PB, McMaster WR et al: Two subsets of rat T lymphocytes defined with

- monoclonal antibodies. *Eur J Immunol* 10 : 609—615, 1980
- 7) Zeidman I, Gamble WJ, Clovis WL : Immediate passage of tumor cell emboli through the liver and kidney. *Cancer Res* 16 : 814—815, 1956
 - 8) Fisher ER, Fisher B : Experimental studies of factors influencing hepatic metastases. 1. The effect of number of tumor cells injected and time of growth. *Cancer* 12 : 926—928, 1959
 - 9) Koike A, Nakazato H, Moore GE : The fate of Ehrlich cells injected into the portal system. *Cancer* 16 : 716—720, 1963
 - 10) Fidler IJ : General consideration for studies of experimental cancer metastasis. *Methods Cancer Res* 15 : 399—439, 1978
 - 11) Clifton EE, Agostino D : Factors affecting the development of metastatic cancer : Effect of alterations in clotting mechanism. *Cancer* 15 : 276—283, 1962
 - 12) Fisher B, Fisher ER : Experimental studies of factors which influence hepatic metastases. 8. Effect of anticoagulants. *Surgery* 50 : 240—247, 1961
 - 13) Honn K, Cicone B, Skoff A : Prostacyclin : A potent antimetastatic agent. *Science* 212 : 1270—1272, 1981
 - 14) 村沢賢一 : マイトマイシン C による癌転移増強作用. *日外宝* 52 : 670—679, 1983
 - 15) Sakurai Y, Tukagoshi S, Satoh H et al : Tumor inhibitory effect of a streptococcal preparation (NSC-B116209). *Cancer Chemother Rep Part 1* 56 : 9—17, 1972
 - 16) Ono T, Kurata S, Wakabayashi K et al : Inhibitory effect of a streptococcal preparation (OK-432) on the nucleic acid synthesis in tumor cells in vitro. *Gann* 64 : 59—69, 1973
 - 17) 田中憲一, 鈴木利光, 大星章一 : 溶連菌製剤 OK-432 処理マクロファージの抗腫瘍性に関する研究. *癌と化療* 5 : 1233—1241, 1978
 - 18) 北川恒代 : ラット膀胱癌の移植系, 培養系の樹立とその抗悪性腫瘍のスクリーニングへの応用性の検討. *癌と化療* 2 : 985—993, 1970
 - 19) Ishii Y, Yamaoka H, Toh K et al : Inhibition of tumor growth in vivo and in vitro by macrophages from rats treated with a streptococcal preparation, OK0432. *Gann* 67 : 115—119, 1976
 - 20) 服部隆延, 山本 繁, 佐藤 博ほか : 溶連菌製剤 (OK-432) 導入による癌の多剤併用療法. *癌の臨* 19 : 929—934, 1973
 - 21) Oshimi K, Kano S, Takaku F et al : Augmentation of mouse natural killer cell activity by a streptococcal preparation, OK-432. *J Natl Cancer Inst* 65 : 1265—1269, 1980
 - 22) Kai S, Tanaka J, Nomoto K et al : Studies on the immunopotentiating effects of a streptococcal preparation, OK-432. *Clin Exp Immunol* 37 : 98—105, 1979
 - 23) Sakai S, Ryoyama K, Koshimura S et al : Studies on the properties of a streptococcal preparation OK-432 (NSC-B116209) as an immunopotentiator. *Jpn J Exp Med* 46 : 123—133, 1976